Abteilung für Innere Medizin II
der Universität Ulm
ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. V. Hombach

PPARα-Aktivierung hemmt die Expression von Tissue Factor in humanen Monozyten, Makrophagen und THP-1 Zellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Nurcan Incekara, geb. Yilmaz
aus Reutlingen

2006

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. Nikolaus Marx
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. Martin Griesshammer
Tag der Promotion:	21.06.2007

Für meine Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen **1**

1. Einleitung **3**

1.1 Atherosklerose 3

1.2 Pathogenese der Atherosklerose 4

1.3. Gewebsthromboplastin (Tissue Factor, TF) 7

1.3.1 Proteinaufbau und Gen-Lokalisation von Tissue Factor 7

1.3.2 Funktion des Tissue Factors in der Gerinnungskaskade 8

1.3.3 Tissue Factor Expression in Monozyten / Makrophagen 9

1.4. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) 11

1.4.1. Struktur und Funktion der PPARs 12

1.4.2. Die Unterformen der PPARs 13

1.5. Ziel der Arbeit und Fragestellung 15

2. Material und Methoden **16**

2.1. Substanzen und Lösungen 16

2.2. Geräte und Kids 19

2.3. Monozytenisolierung und Zellkultur 20

2.4. Monozyteninkubation 21

2.5. RNA-Isolierung 23

2.6. Northern Blotting 24

2.7. Radioaktive Markierung der DNA-Sonden 25

2.8. THP-Zellen-Kultivierung 26

2.9. Makrophagendifferenzierung 27

2.10. Statistik 28

3. Ergebnisse **29**

3.1. Die TF-mRNA Expression von LPS-induzierten Monozyten wird durch PPARα aber nicht durch PPARγ gehemmt 29

3.2. PPARα Aktivator WY inhibiert die LPS induzierte TNFα Expression in humanen Monozyten 30

3.3. PPARα Aktivator WY inhibiert die LPS induzierte TF-Aktivität 32

3.4. PPARα Aktivator WY hat keine Wirkung auf die TF mRNA-Stabilität 33

3.5. PPARα- Aktivator WY reduziert die TF-Expression in-vitro differenzierten Makrophagen 34

3.6 WY 14643 hemmt die LPS-induzierte TF mRNA Expression in THP-1-Zellen 36

4. Diskussion **38**

4.1 Atherosklerose und erhöhte TF Expression 39

4.2 Hemmung der TF Expression in vivo 40

4.3 PPARα in vaskulären Zellen 42

4.4 Anti-inflammatorische Funktionen des PPARα 43

5. Zusammenfassung **46**

6. Literaturverzeichnis **47**

7.Danksagung **60**

Abkürzungen

15d-PGJ2	15-deoxy-Prostaglandin-J2
ANOVA	analysis of variance
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
Co	Kontrolle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
HBSS	Hanks balanced salt solution
HWZ	Halbwertszeit
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-2	Interleukin-2
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	macrophage chemoattractant protein 1
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
n	Fallzahl
NSB	Northern sample buffer
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline
PDGF-BB	Isoform des platelet derived growth factor
PMA	phorbol myristate acetate
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PS	Penicillin/Streptomycin

PUFA	Poly unsaturated fatty acids
RA	9-cis retinoic acid
RPM	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RXR	retinoic x receptor
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SEM	standard error of mean
SSC	Saline sodium citrate
THP-1	monozytenähnliche Zellen
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
TF	Tissue factor, Gewebsthromboplastin
VCAM	vascular smooth muscle cells
WY 14643	4-Chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidin-ylthio acetic acid

Einleitung

1.1 Atherosklerose

Atherosklerose bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen verursachen, laut einem Bericht des European Cardiovascular Disease Statistics 2005 [53], jedes Jahr weiterhin über 4,35 Millionen Todesfälle in Europa. Somit bleiben diese Erkrankungen die führende Haupttodesursache von Männern und Frauen in der industrialisierten Welt.

Bei der Atherosklerose handelt es sich um einen chronisch verlaufenden Prozess, durch den Blutgefäße sich zunehmend verhärten und verdicken. Die Folge ist eine Verengung und ein Elastizitätsverlust in diesen Gefäßen. Dieser Prozess entwickelt sich über Jahre bis Jahrzehnte. Der Beginn dieser Erkrankung wird schon im Säuglings- und Kleinkindalter durch die so genannten „fatty streaks“ als früheste Form der atherosklerotischen Plaque beschrieben [44,47]. Diese inflammatorische Verletzung, welches reversibel ist, kann sich vollständig entwickeln, und in eine atherosklerotische Läsion fortschreiten, welche die klassischen pathohistologischen und funktionelle Folgen der Artherosklerose anzeigen, wenn zusätzlich die Risikofaktoren Hypercholesterinämie, Hypertension, Nikotinkonsum, Diabetes mellitus oder Übergewicht vorhanden sind. Diese frühen Veränderungen laufen zunächst symptomlos ab, klinische Auffälligkeiten treten bei den Patienten meist erst ab dem mittleren und höheren Lebensalter mit den häufigsten Folgekomplikationen der Atherosklerose, als Herzinfarkt und Schlaganfall auf.

1.2. Pathogenese der Atherosklerose

Das klassische Konzept der Pathogenese von Atherosklerose hat sich in den letzten Jahrzehnten bedeutend geändert. Anfangs wurde noch angenommen, dass der atherosklerotische Prozess in der Ablagerung von Lipiden und Lipoproteinen in der Gefäßwand besteht. Neueste Fortschritte in der grundlegenden Wissenschaft zeigen eine bedeutende Rolle der Inflammation in allen Stufen der Atherosklerose, von der Initiation bis zur Progression und letztendlich der thrombotischen Komplikation [34,36]. Damit ist heute der Prozess der Atherosklerose als sehr komplex zu betrachten. Im Folgenden werden die drei Stufen eines Atheroms beschrieben: Initiation, Progression und letzten Endes der Komplikation.

Initiation der Läsion

Schon im Jahre 1856 vermutete Virchow, dass die Entstehung arteriosklerotischer Verletzungen durch Schädigung des Gefäß-endothels hervorgerufen wird. Diese These hat heute noch seine Gültigkeit, jedoch wird diese endotheliale Verletzung derzeit als endotheliale Dysfunktion beschrieben, welches das frühe Stadium der Atherogenese kennzeichnet. Mögliche Ursachen für diese endotheliale Funktionsstörung, sind erhöhtes und modifiziertes LDL, Nikotinabusus, Hypertonie, Diabetes mellitus, genetische Änderungen, und Kombinationen von diesen oder anderen Faktoren [55]. In dieser frühen Phase der Atherosklerose ist die Permeabilität für Lipoproteine und anderer im Plasma zirkulierende Stoffe deutlich erhöht. Es kommt zur Aktivierung der Endothelzellen, welche die Expression von

Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche vermehren. Bestimmte Adhäsionsmoleküle, so genannte Selektine, vermitteln zunächst den vorübergehenden Kontakt von Monozyten und T-Lymphozyten mit dem geschädigten Endothel [71]. Eine andere Gruppe von Adhäsionsmolekülen, so genannte Vascular Cellular Adhesion Molecules“ (VCAMs), werden gebildet zur festen Anheftung dieser Blutzellen an die Gefäßwand [34]. In der weiteren Entwicklung der Atherosklerose dringen vor allem zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten direkt in die Arterienwand ein. Vermittelt wird dies u.a. durch das Chemokin Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1). Es findet die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen statt, diese exprimieren dann Scavenger Receptoren, welche modifizierte Lipoproteine binden und aufnehmen. Es entstehen die so genannten Schaumzellen, charakteristische Zellen der atherosklerotischen Plaque, die dann auch als Fatty streak bezeichnet werden. Die Makrophagen und die eingewanderten Leukozyten setzen zudem vermehrt pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha), Interleukine (IL), Wachstums-faktoren und andere Mediatoren frei. Dies führt zur weiteren Leukozyten Rekrutierung und Aktivierung von glatten Muskelzellen, welche schließlich aus der Media in die intimale Läsion einwandern und hier proliferieren.

Progression des Atheroms

Makrophagen und T-Lymphozyten akkumulieren in der sich vergrößernden Läsion. Ein nekrotischer Kern in der Läsion entsteht durch Apoptose von Zellen und weiterer Lipidaufnahme.

Eingewanderte glatte Muskelzellen formen einen faserigen Verschluss, welches der Plaque die mechanische Stabilität verleiht, und den Lipidkern vom zirkulierenden Blut trennt [55].

Thrombotische Komplikationen des Atheroms

Das Risiko für einen akuten Koronararterienverschluss durch eine Thrombose ist abhängig von der Plaquestabilität und weniger vom Stenosegrad des Gefäßes. Eine stabile Plaque wird instabil, wenn es zu verminderter Bildung oder vermehrtem Abbau der extrazellulären Matrix kommt. Die extrazelluläre Matrix wird gebildet von den glatten Muskelzellen. Makrophagen und Schaumzellen geben sogenannte degradierende Matrixmetalloproteinasen frei, die diese extrazelluläre Matrix abbauen. Die Folge ist eine Ausdünnung der fibrösen Kappe. Unter dem Einfluss von Scherkräften kann die fibröse Kappe letztendlich aufreißen [37]. Es kommt zur vermehrten Bildung von Tissue factor, exprimiert von Makrophagen und Monozyten, welches schließlich die Gerinnungskaskade aktiviert. [72]. Klinisch zeigt sich die Plaqueruptur mit folgender Thrombusformation als instabile Angina pectoris oder akutem Myokardinfarkt.

1.3. Gewebsthromboplastin (Tissue Factor, TF)

1.3.1 Proteinaufbau und Gen-Lokalisation von Tissue Factor

Tissue Factor (TF) der Gefäßwand wird als potentester Initiator für Hämostase und Thrombose beschrieben.
TF ist ein integrales Membranglykoprotein, welches aus 263 Aminosäuren besteht. Das Protein ist zusammengesetzt aus drei Domänen: einem großen extrazellulären Domäne mit 219 Residuen, einer transmembranären mit 23 und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne mit 21 Residuen [46,59]. Nemerson beschreibt TF als ein Protein mit reichlichen Carboanhydraten, dieses dient vermutlich für die richtige Orientierung auf der Zellmembran [48]. Die Codierung von TF befindet sich auf humanem Chromosom 1, lokalisiert an der Stelle p21-p22 [15, 58].

Normalerweise ist TF im Blutkreislauf nicht vorhanden und hat auch kein Kontakt zu dem Kreislauf. [48]. In normalen Blutgefäßen wird TF in der Intima und Media nicht exprimiert [13,72].Drake et. al zeigten das TF in der Adventitia der Gefäße, Organkapseln, Epidermis und mucosalem Epithel vorhanden ist [13]. Besonders wurden prominente Expression von TF in Herzmyozyten, dem cerebralen Cortex, renalen Glomeruli und in der Lunge berichtet.

1.3.2 Funktion von Tissue Factor in der Gerinnungskaskade

Unter physiologischen Verhältnissen ist die Lokalisation von TF in der Gefäßwand strikt getrennt von den plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Es wird subendothelial durch glatte Muskelzellen und in der Adventitia durch Fibroblasten synthetisiert [72]. Nur nach Wegfallen der endothelialen Barriere kommt es zum Kontakt von TF mit dem zirkulierenden Blut und dadurch zur Bildung des TF/VIIa-Komplexes.
Die Kaskadentheorie der Blutgerinnung wird eingeteilt in einen extrinsischen (verursacht durch TF) und einen intrinsischen Weg, wobei mit Aktivierung von dem Faktor X beide Wege in einen gemeinsamen einmünden. Da der TF/VIIa-Komplex auch Faktor IX aktiviert, ist TF auch ein wesentlicher Bestandteil des intrinsischen Aktivierungswegs [72]. Folgende Abbildung 1 zeigt schematisch die extrinische Kaskade [45]:

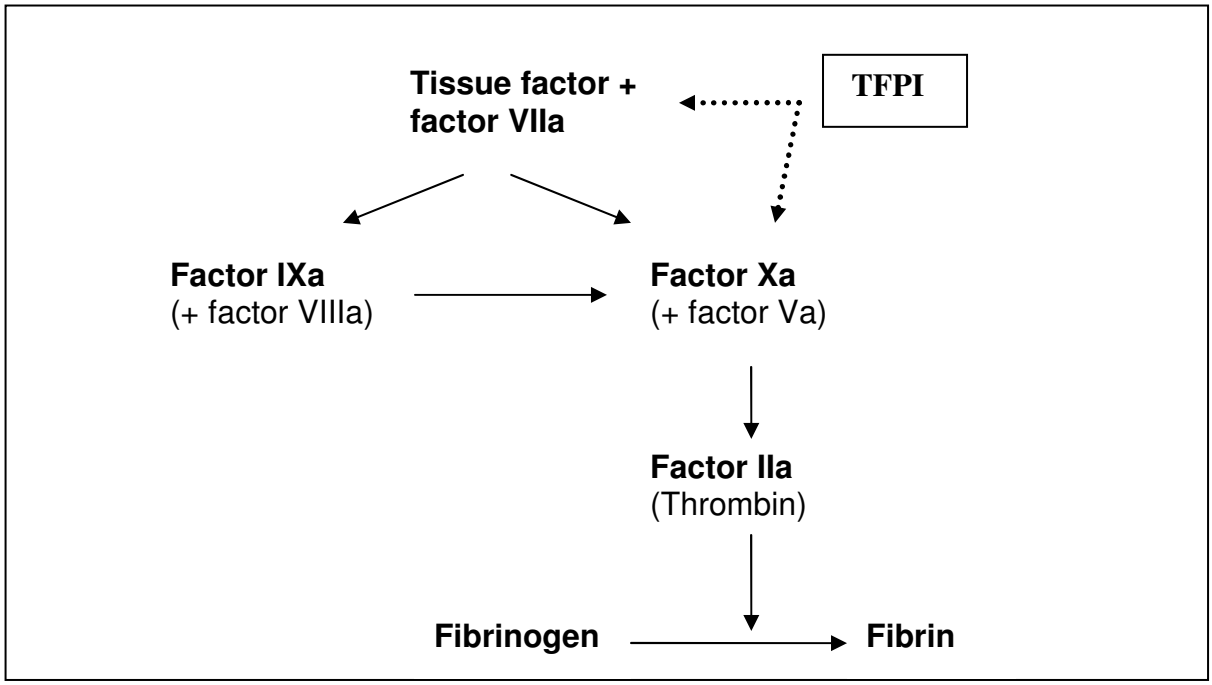

Abbildung 1: Eine vereinfachte schematische Darstellung der extrinsischen Kaskade [45]. TFPI= tissue factor pathway inhibitor.

Die extrazelluläre Domaine des TF bindet mit dem zirkulierenden Gerinnungsfaktor VII, welches sehr schnell in den katalytisch aktiven TF-VIIa-Komplex umgewandelt wird [20].
TF und Faktor VII haben eine hohe Affinität zueinander, in physiologischen Konzentrationen haben diese beiden Komponenten alleine keine prokoagulatorische Aktivität [45]. Dieser TF-VIIa-Komplex ist zudem ein sehr effektives Enzym, das die Konversion von Faktor IX zu IXa und Faktor X zu Xa katalysiert. Letztendlich führt dieser Weg zu der Bildung von Thrombin, welches wiederum die Formation von Fibrin katalysiert und ein Blutgerinnsel entsteht. TFPI-1 ist ein zentraler Inhibitor des exogenen Weges der Blutgerinnung, dieser wird haupsächlich in den vaskulären Zellen synthetisiert.

1.3.3 Tissue Factor Expression in Monozyten / Makrophagen

In gesunden Arterien ist Tissue factor normalerweise in der Adventita vorhanden. Bei atherosklerotischen Arterien, ist TF hauptsächlich in den Plaques nachzuweisen, und wird in allen Stadien der Atherosklerose exprimiert [23]. Makrophagen exprimieren TF, so dass es reichlich vorhanden ist in dem azellulären Lipidkern [31]. Der lipidreiche Kern des Plaques besitzt einen hohen Anteil von TF, weswegen sie auch als Plaques mit hoher Thrombogenität bezeichnet werden, im Gegensatz zu Plaques mit weniger lipidbeladenen Makrophagen [33, 68].

Es werden verschiedene Mechanismen beschrieben, die eine gesteigerte prokoagulatorische Aktivität von mononukleären Zellen

auslösen. Lymhozyten können z.B. mit Monocyten und Makrophagen über zwei unabhängige Modelle zellulärer Interaktion zusammenwirken, die auch parallel ablaufen können [21]. Das erste Modell beschreibt spezifische Zytokine, wie IL-2, TNF-α und IFN-γ, die durch Th-1 Zellen produziert werden. Diese Zytokine können die TF-Expression in mononukleären Zellen induzieren [12]. Umgekehrt, ist die Hemmung von der TF Expression vermittelt von TH-2 Zellen abgeleiteten Zytokinen: IL-4, IL-13 und IL-10 und dies könnte beim Verhindern der Thrombosebildung eine Bedeutung haben [12,51]. Das zweite Modell beschreibt die T- Zell-Bindung an den CD40 Rezeptor, welches auf den Zellmembranen von Monocyten und Makrophagen exprimiert wird. Diese Verbindung induziert wiederum die TF Expression auf menschlichem Monozyten und Makrophagen [38].
Weiterhin wird eine Isoform des platelet-derived growth factors, das PDGF-BB von aktivierten Plättchen freigegeben. Diese PDGF-BB induzieren die TF-Expression auf der Oberfläche von humanen Monozyten und von glatten Gefäßmuskelzellen [16,66]. Auch Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), die von Gefäßmuskelzellen produziert werden, induzieren dosisabhängig die TF-Expression in humanen Monozyten [54].
Klinisch zeigt sich ein erhöhte monozytäre TF-Expression bei Patienten mit instabiler Angina pectoris [1,3,63], nach akuten Myokardinfarkt [18,50], sowie während extrakorporaler Zirkulation bei aortokoronarer Bypassoperation [49].

Es sind bisher viele Mechanismen beschrieben worden, die zu einer Induktion von TF-Expression in Monozyten führen. Doch über inhibitorische Mechanismen der TF-Expression sind wenig bekannt.

In den letzten mehreren Jahren sind Peroxisome-proliferator-activated receptors (PPARs) als bedeutsame Regulatoren der Genexpression in vaskulären Zellen erkannt worden [25,27,40,41,42,56,64]. In einer Studie von Harker im Jahre 1993 konnte gezeigt werden, dass eine Diät mit Fischöl, das reich an vielfach-ungesättigten Fettsäuren (PUFA) ist, die TF-Expression in mononukleären Zellen reduziert [22]. PUFA ist ein Ligand für den nukleären Transkriptionsfaktor Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) [29]. In dieser Arbeit soll nun untersucht werden ob PPARα ein möglicher inhibitorischer Regulator der TF-Genexpression in Monozyten sein könnte.

1.4. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)

Im Jahre 1990 berichteten Isemann und Green von einem nukleären Rezeptor namens Peroxisome proliferators-activated Receptor [26]. Diese PPARs wurden zunächst bei Nagern als Rezeptoren für lipidsenkende Substanzen identifiziert, die in der Leber zur Vermehrung und Vergrößerung von Peroxisomen führen. Jedoch konnte diese Proliferation der Peroxisomen bei Menschen nie beobachtet werden, weswegen auch der noch heute benutzte Name nicht korrekt ist. Heute werden PPARs bezeichnet als nukleäre Transkriptionsfaktoren beim Menschen, welches wichtige Regulatoren der Genexpression in vaskulären Zellen sind, vor allem im Lipidmetabolismus, der Glucose-Hämostase und der Inflammation.

1.4.1. Struktur und Funktion der PPARs

PPARs gehören zu der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren, wie z.B. der Steroidrezeptoren. Es sind ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren, welche die Expression bestimmter Zielgene regulieren [60,61]. PPARs sind kompakte Proteinmoleküle und besitzen fünf oder sechs strukturelle Regionen, die auf vier funktionelle Domänen aufgeteilt werden. Das Domain C wird als DNA-bindende Stelle und Domain E/F als Liganden-bindende Stelle beschrieben [70]. PPAR wird zunächst durch einen Liganden an der jeweiligen Domaine aktiviert, daraufhin bildet das aktivierte Protein mit dem Retinoic x receptor (RXR) Hetordimere. Schließlich binden diese Heterodimere an definierte PPAR-response Elemte (PPRE) in der Promotorregion ihrer Zielgene, welches dann letztendlich zur Proteinsynthese führt (siehe Abbildung 2) [43].

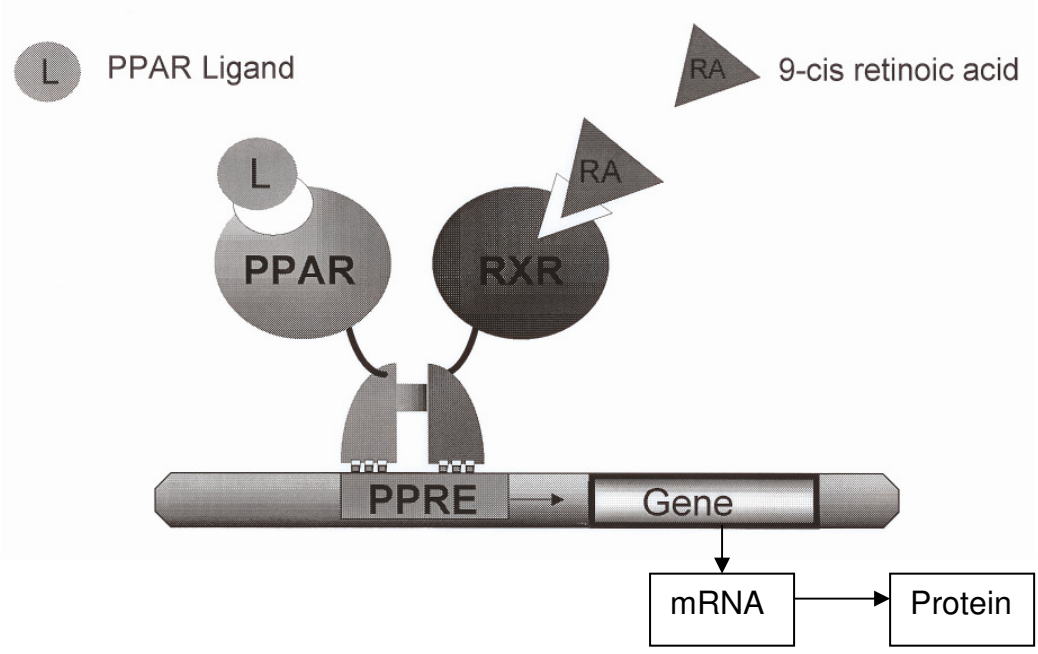

Abbildung 2: Schematische Darstellung der PPARs auf die Genexpression [43].

1.4.2. Die Unterformen der PPARs

PPARs werden bisher unterteilt in die Unterformen: PPAR alpha(**α**), PPAR gamma(**γ**) und PPAR beta/delta(**β/δ**). Jede Unterform besitzt verschiedene Liganden- Aktivatoren und auch unterschiedliche Zielgene, die sie regulieren.

PPAR α

PPARα wird hauptsächlich exprimiert in der Leber, Niere und Herz wo es vor allem die Genexpression im Lipidmetabolismus reguliert. Zu den Aktivatoren für PPARα gehören vielfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA), Eicosanoide, sowie lipidsenkende Fibratderivate, wie Fenofibrat, WY14643 oder Gemfibrozil [17,30].
Die Expression von PPARα konnte in verschiedenen vaskulären Zellen wie humanen Endothelzellen [10,42], in glatten Gefäßmuskeln [64], und in Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden [6].

PPAR β/δ

Die Expression von PPAR β/δ wird ubiquitär beschrieben, doch sind spezifische Liganden, sowie Funktion bislang weitgehend unbekannt gewesen. Nach neuesten Ergebnissen scheinen ungesättigte Fettsäuren, Prostaglandine und synthetische Verbindungen als Liganden PPAR β/δ zu aktivieren. PPARbeta/delta stimuliert die Fettsäureoxidation vorwiegend im Skelettmuskel [14].

PPAR γ

PPARγ ist der Schlüsselregler der Glucose-Hämostase und Adipogenese. Liganden für PPARγ sind natürlich auftretende Prostaglandinderivate, oxidierte Linolensäure, als Komponenten von oxidiertem LDL, sowie eine Gruppe von neuen Antidiabetika – Thiazolidedione, wie Troglitazone, Pioglitazone oder Rosiglitazone. [65,67].

1.5. Ziel der Arbeit und Fragestellung

Monozyten und Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose, außerdem sind diese Zellen potente Aktivatoren der Blutgerinnung, da sie die Fähigkeit haben TF zu exprimieren.

Patienten mit akutem Koronarsyndromen zeigen eine verstärkte monozytäre TF-Expression [1,50], welches wiederum die Thrombogenität in den arteriosklerotischen Läsionen deutlich erhöht. Eine Hemmung der TF-Expression könnte sich günstig auf den klinischen Verlauf akuter Koronarsyndrome auswirken.

Da über PPARs auch ein antiinflammatorischer Effekt beschrieben wird, könnte die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPARα einen potentiellen Mechanismus zur Hemmung der TF-Expression beitragen.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich folgenden Fragestellungen:

1. Beeinflussen PPAR α und PPAR γ Aktivatoren die TF-mRNA Expression von LPS- induzierten Monozyten?
2. Hemmen PPAR- Aktivatoren (α und γ) die LPS induzierte TNFα Expression in humanen Monozyten?
3. Hemmt der PPAR α Aktivator WY die TF mRNA Expression konzentrationsabhängig?
4. Beeinflusst der PPARα-Aktivator WY die Halbwertszeit der TF mRNA?
5. Reduziert der PPARα- Aktivator WY die TF-Expression bei in-vitro differenzierten Makrophagen?
6. Hemmt WY die LPS-induzierte TF mRNA Expression in THP-1 Zellen?

2. Material und Methoden

2.1. Substanzen und Lösungen

Agarose	LifeTechnologies, USA
Agarose-Gel Northern Blot	1,2 g Agarose (1,2%) 72ml steriles Wasser 10ml 10X running buffer 18ml Formaldehyd
Aqua Spülwasser	Delta-Pharma, Germany
BPB	Sigma Diagnostics, USA
Denhardts	Mallinckrodt, Netherlands
DEPC	Sigma Diagnostics, USA
Ethidiumbromid	Promega Corporation, USA
Formamid	Merck, Germany
HBSS	Sigma Diagnostics, USA
Histopaque	Sigma Diagnostics, USA
Hybridsierungspuffer	50 ml deionisiertes Formamid 5 ml Denhardts 100x 25 ml SSC 20x 2,5 ml SDS 20% 16,5 ml Aqua bidest. 1 ml Salmon Sperm DNA (10mg/ml)

Master Mix	5 µl DEPC-H_2O
	15 µl NSB
	3,5 µl BPB
	0,1 µl Ethidiumbromid
Medium für Monozyten	500ml RPMI
	25 ml Humanes Serum
	5 ml Penicillin/Streptomycin
NSB	200 µl deionisiertes Formamid
	70 µl Formaldehyd 37%
	40 µl Running Buffer 5x
PBS	NaCl 80g
	KCl 2g
	Na_2HPO_4 10,85g
	KH_2PO_4 2g
	Aqua bidest 1000ml
	pH=7,4
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Germany
Percoll	Sigma Diagnostics, USA
Running buffer 10x Northern Blot	41,20g MOPS
	3,28 g Natriumacetat
	ad 900ml Aqua bidest.
	10 ml EDTA 0,5 M
Salmon Sperm	Amersham pharmacia, UK

SDS	Roth, Germany
SSC 20x	175,3g NaCl 88,2 g Natriumcitrat ad 1000ml Aqua bidest pH=7,0
Waschlösung I	447,5 ml Aqua bidest 50 ml SSC 20x 2,5 ml SDS 20%
Waschlösung II	495 ml Aqua bidest. 2,5 ml SSC 20x 2,5 ml SDS 20%

2.2. Geräte und Kids

Blotgerät	Bio-Rad, USA
Chromatographiepapier	Whatman International, England
Crosslinker	Fluo-Link FLX, Biometra, Germany
Gelkammer Northern Blot	Biometra, Germany
Hybrdisierungsofen	Heraeus, Germany
Hybridisierungsröhrchen	Biometra, Germany
Labelling System	redi prime II, amersham pharmacia
Leukosep-Isolationsröhrchen	Greiner Labortechnik, Germany
Nylonmembran Northern Blot	Hybond, amersham pharmacia UK
Photometer	Beckman, USA
Pipetten	Gilson, France
Reaktionsplatten	96-well, Greiner, Germany
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Germany
Röntgenfilme	Hyperfilm, amersham pharmacia UK
Röntgenkassetten	rego, Germany
Vakuumtrockner	SpeedVac, Savant, Germany
Zellkulturplatten	MULTIWELL, Becton Dickinson, USA
Zellzähler	CASY 1, Schärfe System, Germany
Zentrifuge	Varifuge 3.0R, Heraeus, Germany

2.3. Monozytenisolierung und Zellkultur

Für die Isolation von Monozyten wurden frische Buffy-coats genommen, die etwa 60ml Patientenblut enthielten. Diese Blutkonzentration wurde auf 80ml mit 1-fach-PBS verdünnt, damit sie auf vier Leucosep-Isolationsröhrchen (50ml Polypropylröhrchen) verteilt werden konnten. Zuvor wurden die Leucosep-Röhrchen mit 15ml Ficoll-Trennlösung gefüllt und 1 min mit 2300 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert, damit sich die Lösung unter dem Filter absetzten konnte. Nach Zugabe von jeweils 20 ml Blut, folgte eine weitere Zentrifugation mit 2500 U/min für 10 min bei RT. Durch diesen Schritt kam es, entsprechend der unterschiedlichen Dichte der Zellen, zur Ansammlung von mononucleären Zellen (MNZ) oberhalb des Filters in einer Bande zwischen Serum und Trennlösung. Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten bildeten unter dem Filter das Sediment. Der Serumüberstand wurde abpipettiert und verworfen, damit man die Zellbande entnehmen konnte. Um die Zellen zu Waschen wurden die Zellen in 50ml Leucosep-Röhrchen (ohne Filter) gegeben und in 50ml 1-fach-PBS gelöst. Es folgte wieder eine Zentrifugation für 10 min mit 1100 U/min bei 23°C. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschvorgang wiederholt. Danach wurde das Pellet in 3ml PBS (1-fach) suspendiert.

Da die Zellbande aus Monozyten und Leukozyten bestand, musste eine Trennlösung herstellt werden, um die Monozyten aus den MNZ zu isolieren. Dazu wurden zu 30ml Percoll noch 5ml HBSS hinzugefügt. Diese Lösung sollte einen pH-Wert von ca. 7,2 haben damit es zu einer Zelltrennung kommt, welches durch Zugabe von Salzsäure oder Natronlauge einstellt werden konnte. Vier 10ml

Polypropylen-Röhrchen wurden jeweils mit 7ml der Trennlösung aufgefüllt. Zu jedem Röhrchen wurde nun die 3ml Zellsuspension dazugegeben und sorgfältig gemischt. Darauf folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 30°C in einem Sorvall RC-5B-Festwinkelrotor ohne Bremse. Oberhalb des Röhrchens bildete sich eine weiße Monozytenbande, die mit einer Pipette vorsichtig abgenommen werden konnte. Es folgten wieder zwei Waschvorgänge mit PBS (1-fach). Das übrige Pellet, mit reinen Monozyten, wurde in ca. 5ml Medium (500ml RPMI + 25ml Humanes Serum + 5ml Penicillin/ Streptomycin) gelöst. In einem Zellcounter wurden die Zellen schließlich gezählt und jeweils 10 Mio. Zellen in 5ml Medium in eine Petrischale gegeben. Diese Schalen wurden für 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C kultiviert, um sie für die Stimulationen vorzubereiten.

2.4. Monozyteninkubation

Für die Stimulation der Monozyten benötigten wir aus der Monozytenisolation 50 Mio. Zellen um 5 Ansätze zu bilden, mit jeweils 10 Mio. Zellen pro Ansatz. Die ersten beiden Ansätze dienten als Kontrolle. Die 3. bis 5. Ansätze wurden eine halbe Stunde vorher mit den PPARα- oder PPARγ-Aktivatoren vorbehandelt und dann mit LPS (100 μg/l) für zwei Stunden bei 37°C stimuliert.

Für die Frage ob PPAR-γ-Aktivatoren die TF-mRNA Expression von LPS-induzierten Monozyten beeinflussen wurden folgende Ansätze gebildet:

1. 10 Mio. Zellen
2. 10 Mio. Zellen + LPS (100µg/l)
3. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (250µM) + LPS (100µg/l)
4. 10 Mio. Zellen + PGJ2 (10µM) + LPS (100µg/l)
5. 10 Mio. Zellen + BRL + (10µM) + LPS (100µg/l)

Ob der PPARα Aktivator WY die TF mRNA-Expression konzentrationsabhängig hemmt wurden folgende Ansätze gebildet:

1. 10 Mio. Zellen
2. 10 Mio. Zellen + LPS (100 µg/l)
3. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (1 µM) + LPS (100ng/ml)
4. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (2,5 µM) + LPS (100µg/l)
5. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (10 µM) + LPS (100µg/l)
6. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (25 µM) + LPS (100µg/l)
7. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (100 µM) + LPS (100µg/l)
8. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (250 µM) + LPS (100µg/l)

Nach den 2 Stunden Inkubationszeit wurden diese Ansätze zur RNA-Präperation wie folgt weiterverarbeitet.

2.5. RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den Zellen wurde mit dem Rneasy Kit nach Angaben des Herstellers präpariert, welches auf die Thicyanat-Phenol-Chloroform Methode beruht [7].

Die stimulierten Zellen wurden in 15ml-Falconröhrchen gegeben und mit 1-fachem PBS aufgefüllt. Die Falcons wurden für 5 min. bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. In 600 µl Buffer RLT, das zuvor mit ß_Mercaptoethanol vermischt wurde (10 µl ß-ME pro ml Buffer RLT), konnten die Monozyten resuspendierten werden. Diese Lösung kam auf die Shredder-Säule, welches für 2 min. bei 13000 rpm und RT zentrifugiert wurde. Dieser Schritt diente zum Bilden eines Homogenats in dem die Zellen lysiert wurden. Die Säule konnte danach verworfen werden, übrig blieb der Durchfluß in einer Sammeltube. Zu den einzelnen Tuben mussten jeweils 600 µl 70% Ethanol zugegeben und gut vermischt werden. Dieses Gemisch wurde dann zweimal auf einer Rneasy-Säule für 15 sec. bei 10000 rpm zentrifugiert. Dadurch bindete sich die RNA auf der Membran in dieser Säule. Der Durchfluss, welches wieder unter der Säule in einer Tube aufgefangen wurde, konnte verworfen werden.
Um Kontaminationen zu beseitigen folgte ein Waschritt mit 700 µl RW1-Buffer und zwei Waschritte mit 500 µl RPE-Buffer. Nach jeder Zugabe des Puffers wurde eine Zentrifugation für 15 sec. mit 10000 rpm durchgeführt. Um die RNA aus der Membran anschließend zu eluieren wurde die Rneasy-Säule auf ein Eppi-Röhrchen gesetzt, 30 µl RNAse-freies Wasser zugegben und eine Minute bei 10000 rpm

zentrifugiert. Die Eppi-Röhrchen mit RNA-Inhalt wurden anschließend auf Eis gestellt.

Messung der RNA-Konzentration:

Dazu wurde in einem frischen Eppi-Röhrchen 497,5µl DEPC-Wasser gefüllt, anschließend von jeder Probe 2,5 µl RNA-Lösung hinzugegeben. Mit einem Photometer wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen und daraus die RNA-Konzentration wie folgt berechnet:

$$\text{RNA } (\mu g/\mu l) = \frac{\text{Extinktion x OD (für RNA= 40) x Verdünnung (200)}}{100}$$

Pro Versuch wurde für den einzelnen Ansatz eine RNA-Menge von 5 µg verwendet. Die Proben mit der jeweiligen RNA-Menge wurden in ein RNAse freies Eppi-Röhrchen pipettiert und in einem Vakuumtrockner für etwa 30 Minuten getrocknet, damit die Proben für die weitere Northern Blot-Analyse verwendet werden konnten.

2.6. Northern Blotting

Bei dieser Methode wird die RNA elektrophoretisch in einem denaturierten Formaldehyd-Agarose-Gel in ihre Untereinheiten aufgetrennt und durch Diffusion auf eine Membran transferiert. Diese Membran wird anschließend mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert.

Zunächst wurde ein Formaldehyd-Agarose Gel und ein Master-Mix hergestellt. Die getrockneten RNA-Proben wurden in diesem Mastermix aufgelöst, anschließend in die Taschen des Gels eingebracht. Die Gelkammer wurde mit 1xRunning Buffer gefüllt und die RNA konnte hierin bei 75 Volt für 3-4 Stunden aufgetrennt werden. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert werden, um zu sehen ob eine gleichmäßige Beladung in allen Proben vorlag.
Zum Blotting wurde das Gel luftblasenfrei auf dreilagigem Filterpapier, welches in 20x SSC getränkt wurde, aufgelegt. Darauf erfolgten eine Nylonmembran und wieder Filterpapier und mehrere Lagen Papiertücher. Dieser Aufbau wurde in eine Wanne mit 20xSSC-Lösung gestellt und über Nacht geblottet. Am nächsten Tag konnte die RNA auf der Membran mit UV-licht crossgelinkt werden.

2.7. Radioaktive Markierung der DNA-Sonden

Zunächst wurde die Membran in 10 ml Hybridisierungslösung in einer Falcon-Tube für 4 Stunden in einem Ofen prähybridisiert. Anschließend wurde die Lösung gegen radioaktiv-markierter DNA ausgetauscht und über Nacht bei 42°C inkubiert. Für die Herstellung dieser DNA-Sonde wurden zuerst 2 µl DNA in 43 µl TE gelöst und diese 10 min. bei 95°C erhitzt. Diese Probe wurde 5 min. auf Eis gelegt und kurz zentrifugiert. Diese denaturierte DNA wurde zur Kit rediprime II zugegeben und mit 5 µl Radioaktivität vermischt. Diese Mischung musste für 10 Minuten auf einen Heizblock mit 37°C gestellt. Mit 5 µl 0,2 M EDTA wurde anschließend die ablaufende Reaktion gestoppt und zur Denaturierung für weitere 5 min. nochmals auf 95° C

gestellt. Nach Abkühlen auf Eis, konnte die Mischung zur Membran gegeben werden. Nach der Inkubationszeit über Nacht, wurde die Membran zur Entfernung nicht spezifisch gebundener radioaktiver DNA gewaschen, dies erfolgte zweimal mit Waschlösung 1 bei 42°C und zweimal mit Waschlösung 2 bei 60°C für jeweils 15 Minuten. Schließlich konnte die Membran nach den Waschschritten in Folie eingepackt und in eine Röntgenkassette eingelegt, und bei -70°C für mehrere Tage exponiert werden. Um sicherzustellen, dass bei jeder Probe gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden, wurde die Membran zum jeweiligen Versuch auch mit einer Sonde für das konstitutionell exprimierte GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase)-Gen hybridisiert.
Alle Ergebnisse wurden mit RNA von Zellen wiederholter Versuche und neu markierten DNA-Sonden reproduziert.

2.8. THP-Zellen-Kultivierung

Die Monozyten ähnliche THP-Zellen erhielten wir von der „American Tissue Culture Collection“. Diese wurden erst für mehrere Tage in einem Medium kultiviert (RPMI von Biochrom + 7,5% Fetales Kalbserum + 5ml Penicillin/ Streptomycin).
Zur Stimulierung dieser Zellen nahmen wir je 10 Mio. Zellen in 5ml Medium mit folgenden Ansätzen:

1. 10 Mio. Zellen
2. 10 Mio. Zellen + LPS (10µg/l)
3. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (100µM) + LPS (10µg/l)

Im nächsten Schritt wurde die RNA aus den THP-Zellen isoliert, die RNA-Konzentration gemessen und 10µg RNA auf das Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen, wie oben beschrieben.

2.9. Makrophagendifferenzierung

Für diesen Versuch isolierten wir erst Monozyten wie in 2.1 beschrieben. In 6-well-plates kultivierten wir mit jeweils 5 Mio. Zellen pro well in 5ml Medium (500ml RPMI + 25ml Humanes Serum + 5ml Penicillin/ Streptomycin) für ca. eine Woche. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt, damit verstorbene Zellreste entfernt werden konnten.
Die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen konnte mikroskopisch beobachtet werden. Es folgte die Stimulation der Makrophagen wie folgt:

1. 10 Mio. Zellen
2. 10 Mio. Zellen + LPS (100µg/l)
3. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (10 µM) + LPS (100µg/l)
4. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (25 µM) + LPS (100µg/l)
5. 10 Mio. Zellen + WY 14643 (100 µM) + LPS (100µg/l)

Wie oben genannt von 2.3 bis 2.5 wurde aus den stimulierten Makrophagen die RNA isoliert, die RNA-Konzentration bestimmt und auf ein Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen. Anschließend folgte die radioaktive Markierung mittels einer DNA-Sonde.

2.10. Statistik

Die Ergebnisse dieser experimentellen Studie wurden als
Mean ± standard error of the mean (SEM) dargestellt. Die Unterschiede wurden mittels ANOVA und nachfolgendem Fisher-Test analysiert. Ein p-Wert< 0,05 wurde hierbei als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Die TF-mRNA Expression von LPS-induzierten Monozyten wird durch PPARα aber nicht durch PPARγ gehemmt

Um zu überprüfen, ob PPARα und PPARγ-Aktivatoren die TF-mRNA Expression beeinflussen, wurden gereinigte Monozyten zunächst mit dem PPARα-Aktivator WY 14643(250µM) und den PPARγ-Aktivatoren 15d-PGJ2 (10µM) und BRL 49653 (10µM) vorbehandelt. Dann wurden diese Zellen 2 Stunden mit LPS(100µg/l) stimuliert, um anschließend die mRNA Expression mittels Northern Blot zu untersuchen. Dabei zeigte sich eine Zunahme der TF mRNA nach reiner LPS-Stimulation. Die Zugabe des PPARα-Aktivators WY 14643 zeigte eine Hemmung der TF-mRNA (siehe Abbildung 3). Die beiden PPARγ-Aktivatoren 15d-PGJ2 und BRL 49653 (Rosiglitazone) zeigten keinen Effekt auf die LPS- induzierte TF-mRNA Expression.

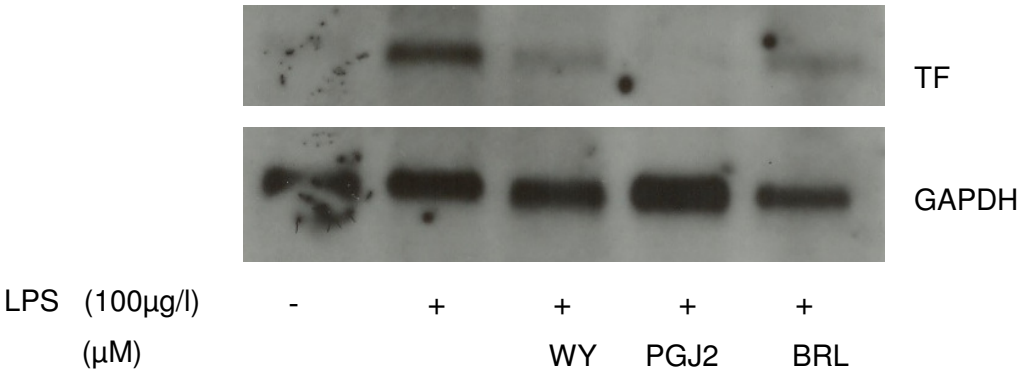

Abbildung 3: PPARα Aktivator WY hemmt die LPS-induzierte TF mRNA Expression. Für diese Northern Blot-Analysen wurden humane Monozyten 30 Minuten mit dem PPARα-Aktivator WY 14643(250µM) und den PPARγ-Aktivatoren 15d-PGJ2 und BRL 49653 (10µM)vorbehandelt und anschließend 2 Stunden mit LPS (100µg/l) stimuliert. Die GAPDH mRNA-Expression dient hierbei zur Darstellung, dass gleiche Mengen intakter RNA aufs Gel aufgetragen wurden. Vier unabhängige Experimente zeigten gleiche Resultate.

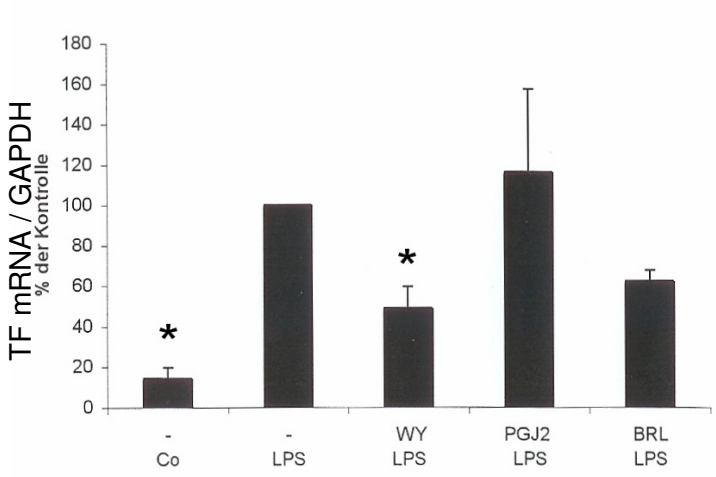

Abbildung 4: Der PPARα-Aktivator WY 14643 reduziert die TF-Expression in humanen Monozyten. Die Ergebnisse wurden als Prozentsatz von LPS-stimulierten Zellen (% der Kontrolle) ausgedrückt. Die Säulen zeigen mean± SEM an. * P < 0,05 verglichen mit LPS-stimulierten Zellen; n=4.

3.2. Der PPARα Aktivator WY inhibiert die LPS induzierte TNF- α Expression in humanen Monozyten

Um zu untersuchen ob die beobachtete Hemmung auch für die TNF-α Expression gilt, wurden Monozyten wie oben beschrieben vorbehandelt und stimuliert, anschließend wurde mittels Northern-Blot-Analyse die TNF-α mRNA Expression untersucht. Es konnte auch hier gezeigt werden, dass die LPS induzierte TNF-α Expression durch den PPARα Aktivator WY 143643 signifikant gehemmt wird (siehe Abbildung 5). Auch hier haben PPARγ-Aktivatoren keinen Effekt auf die LPS induzierte TNF-α Sekretion.

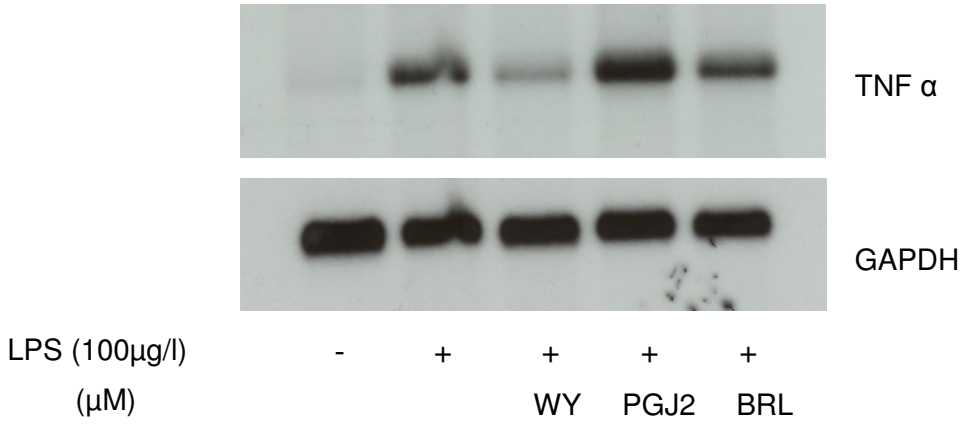

Abbildung 5: Der PPARα Aktivator WY 14643 hemmt die LPS-induzierte TNFα- mRNA Expression. Für die Northern Blot-Analysen wurden humane Monozyten 30 Minuten mit dem PPARα-Aktivator WY 14643(250µM) und den PPARγ-Aktivatoren 15d-PGJ2 (10µM) und BRL 49653 (10µM)vorbehandelt und anschließend 2 Stunden mit LPS (100µg/l) stimuliert. Um sicherzustellen, dass bei jeder Probe gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden, wurde dies mit der GAPDH mRNA-Expression nachgeprüft. Drei unabhängige Experimente zeigten gleiche Resultate.

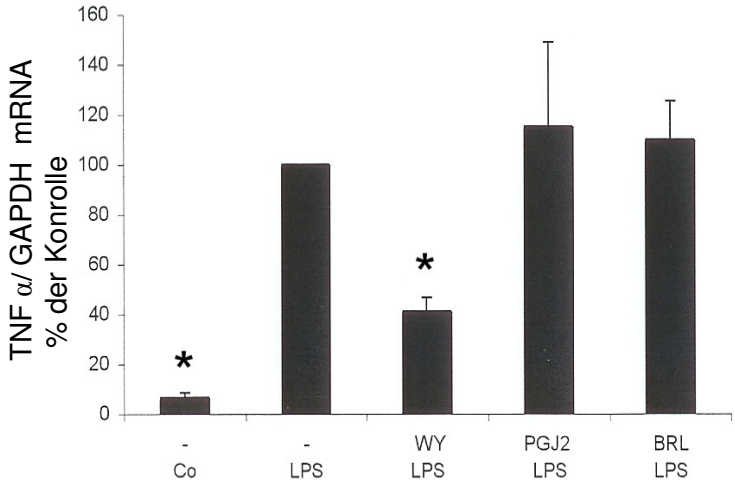

Abbildung 6: Der PPARα-Aktivator WY 14643 reduziert die TNFα-Aktivität und Expression in humanen Monozyten. Die Ergebnisse wurden als Prozentsatz von LPS-stimulierten Zellen (%control) ausgedrückt.
Die Säulen representieren mean± SEM an. * P < 0,05 verglichen mit LPS-stimulierten Zellen; n=3.

3.3. Der PPARα Aktivator WY inhibiert die LPS induzierte TF-Expression konzentrationsabhängig

Um den konzentrationsabhängigen Effekt der PPARα-Aktivität auf die LPS induzierte TF Expression in isolierten humanen Monozyten zu bestimmen, wurden wieder gereinigte Zellen für 30 Minuten mit steigenden Konzentationen des PPARα-Aktivators WY14643 vorbehandelt. Anschließend stimulierten wir die Zellen 2 Stunden mit LPS (100 µg /L), bevor die TF Expression untersucht wurde. Das Ergebnis zeigte bei drei unabhängigen Versuchen eine LPS-induzierte Hemmung der TF-mRNA Expression in einer konzentrationsabhängigen Weise mit einer maximalen Reduktion bei 250 µM WY.

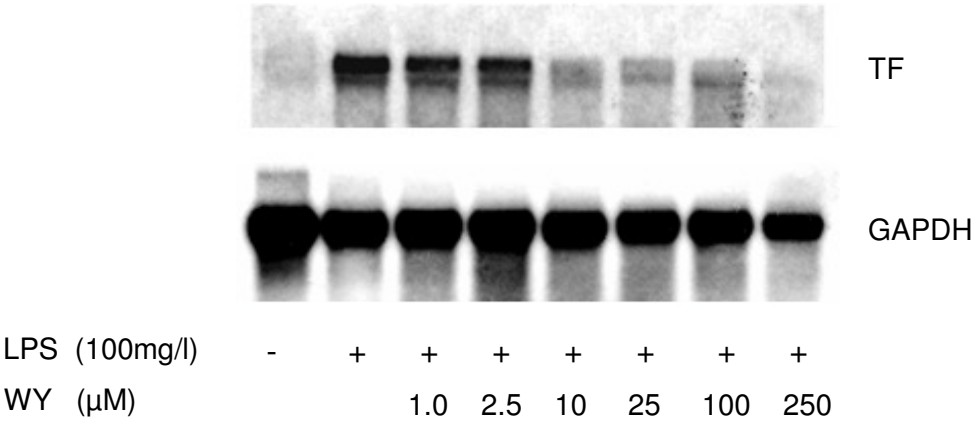

Abbildung 7: Eine Northern Blot Analyse von TF in humanen Monozyten, welche 30 Minuten vorbehandelt wurden mit verschiedenen Konzentrationen von WY, anschließend stimuliert mit LPS (100 µg/L) für 2 Stunden. GAPDH mRNA-Expression dient hierbei wieder zur Darstellung, von Aufladung gleicher Mengen intakter RNA.

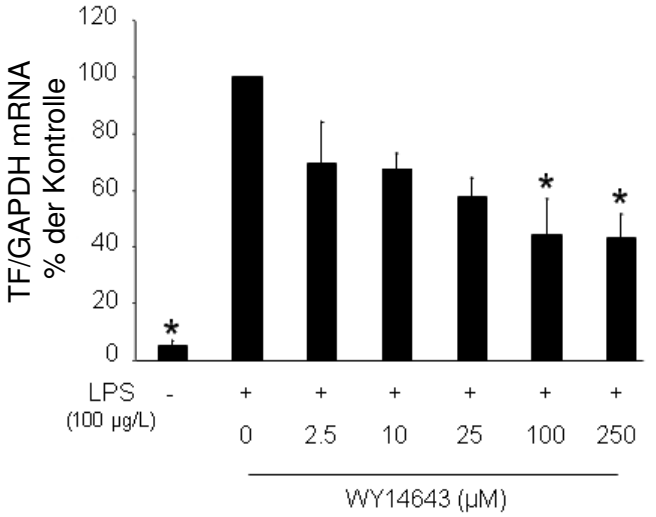

Abbildung 8: WY 14643 hemmt die TF Expression konzentrations-abhängig mit einer signifikanten maximalen Inhibition bei WY 250 µM. Die Ergebnisse wurden als Prozentsatz von LPS-stimulierten Zellen (% der Kontrolle) ausgedrückt. Die Säulen zeigen mean± SEM an. * P < 0,05 verglichen mit LPS-stimulierten Zellen; n=3.

3.4. Der PPARα Aktivator WY hat keine Wirkung auf die TF mRNA- Stabilität

Um zu untersuchen, ob WY 14643 die LPS induzierte Halbwertszeit der TF mRNA Expression beeinflusst, wurden Monozyten für 2 Stunden mit LPS stimuliert, um die TF mRNA-Expression zu induzieren, bevor die Transkription durch Zugabe von Actinomycin D geblockt wurde. Anschließend wurden Zellen jeweils mit oder ohne WY 14643 (250µM) behandelt. Nach 0, 2, 4 und 6 Stunden wurden diese Zellen geerntet und Northern Blot Analysen durchgeführt. Abbildung 9 zeigt, dass WY 14643 keinen Effekt auf die RNA-Stabilität hat.

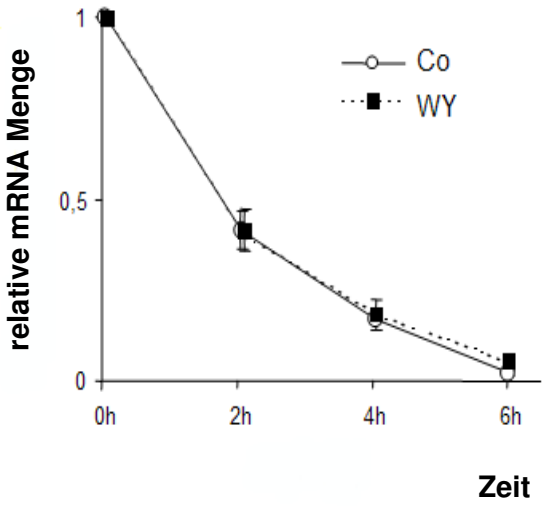

Abbildung 9: PPARα Aktivierung wirkt nicht auf die TF mRNA Halbzeit. Actinomycin D und WY wurden zu humanen Monozyten 2 Stunden hinzugefügt, nachdem sie mit LPS stimuliert wurden. Die Menge der mRNA wurde zu jedem Zeitpunkt verglichen mit der mRNA Level nach 2,4 und 6 Stunden der LPS-Stimulation. Co zeigt die Kontrolle an. Die Ergebnisse ergeben sich aus densitometrischen Daten von drei unabhängigen Experimenten.

3.5. Der PPARα- Aktivator WY reduziert die TF-Expression in-vitro differenzierter Makrophagen.

Um zu bestimmen, ob PPARα Aktivatoren ähnliche Effekte auf die TF-Expression in Makrophagen haben, wurden in vitro differenzierte Makrophagen für die durchgeführten Experimente benutzt. Auch diese Zellen wurden 30 Minuten mit WY 14643 in steigender Konzentration vorbehandelt und anschließend 2 Stunden mit LPS stimuliert. Das Ergebnis zeigte bei vier unabhängigen Versuchen eine maximale Reduktion der LPS-induzierten TF-mRNA Expression bei 100 µmol/L WY.

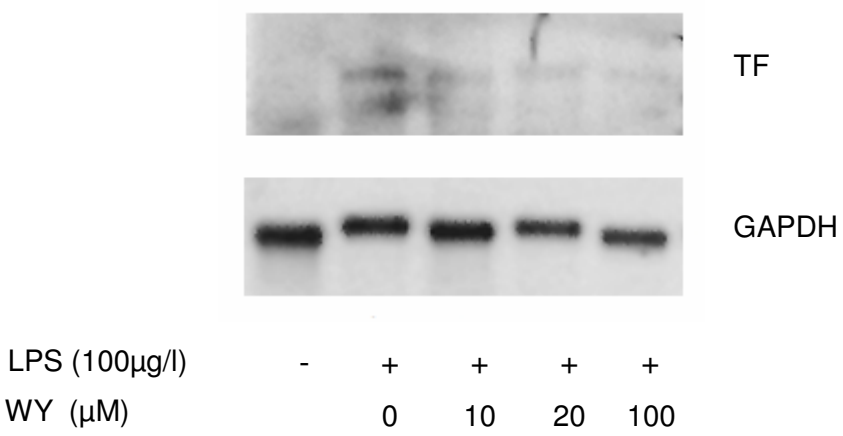

Abbildung 10: Northern Blot Analyse der TF mRNA Expression in humanen Makrophagen. Monozyten wurden nach Differenzierung zu Makrophagen eine halbe Stunde mit WY vorbehandelt, damit sie anschließend mit LPS (100µg/l) stimuliert werden konnten. GAPDH diente wieder zur Darstellung, dass gleiche Mengen intakter RNA aufs Gel aufgetragen wurden.

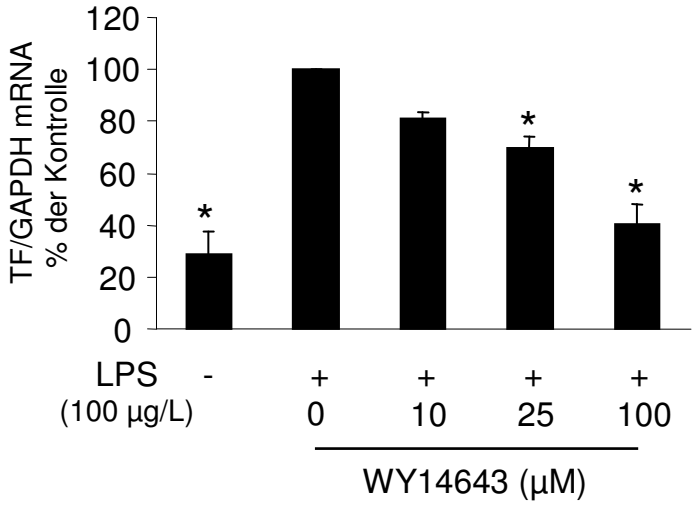

Abbildung 11: TF-Expression bei Makrophagen. Dabei zeigt sich, dass WY 14643 die TF-Expression konzentrationsabhängig hemmt mit einer maximalen Inhibition bei 100µM WY. Die Ergebnisse wurden als Prozentsatz von LPS-stimulierten Zellen (% der Kontrolle) ausgedrückt. Die Säulen zeigen mean± SEM an. * $P < 0,05$ verglichen mit LPS-stimulierten Zellen; n=4

3.6. WY 14643 hemmt die LPS-induzierte TF mRNA Expression in THP-1-Zellen

Frühere Studien haben schon gezeigt, dass Monozyten-ähnliche THP-1 Zellen verwendet werden können, um die Wirkung verschiedener Substanzen auf die TF-Expression zu untersuchen. Die Behandlung der THP-1 Zellen mit dem PPARα- Aktivator WY 14643 hemmt die LPS-induzierte TF mRNA Expression. Für diesen Versuch wurde die Zellen ebenfalls 30 Minuten mit WY 14643 vorbehandelt und anschließend mit LPS (100µg/L) für 2 Stunden stimuliert.

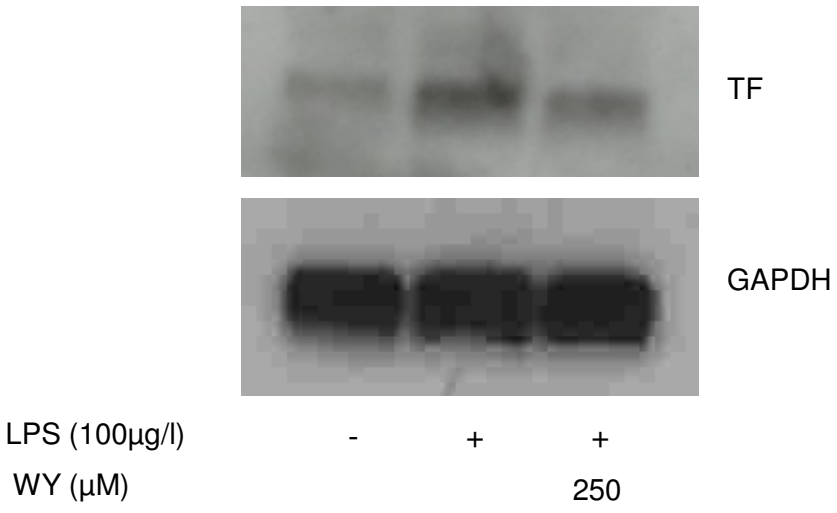

Abbildung 12: Hemmung der LPS-induzierten TF mRNA bei den monozyten-ähnlichen THP-1 Zellen in der Northern Blot Analyse. GAPDH mRNA-Expression dient hierbei wieder zur Darstellung, dass gleiche Mengen intakter RNA aufs Gel aufgetragen wurden.

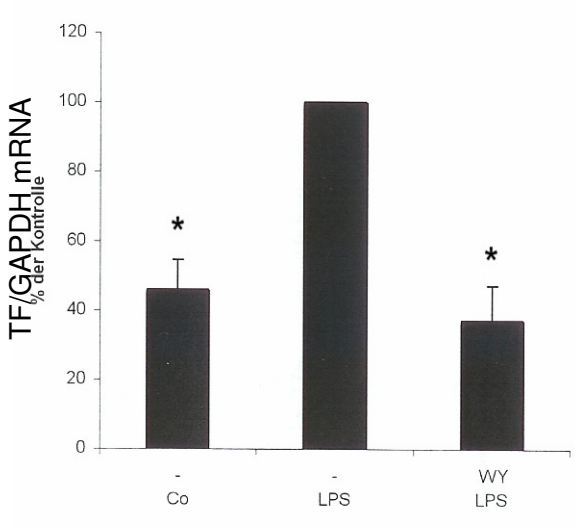

Abbildung 13: WY reduziert die TF Aktivität in monozyten-ähnlichen THP-1 Zellen signifikant. Dazu wurden diese Zellen 30 Minuten mit dem PPARα-Aktivator WY vorbehandelt und anschließend 2 Stunden mit LPS stimuliert. Die Ergebnisse wurden als Prozentsatz von LPS-stimulierten Zellen (% der Kontrolle) angegeben.
Die Säulen zeigen mean± SEM * p< 0,05; n=3.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt des PPARα-Aktivators WY 14643 auf die LPS-induzierte TF Expression in humanen Monozyten, Makrophagen und monozytenähnlichen THP-1 Zellen untersucht werden. Dazu wurden gereinigte Monozyten, in-vitro differenzierte Makrophagen und die THP-1 Zellen, zunächst 30 Minuten mit dem PPARα-Aktivators WY vorbehandelt und danach für zwei Stunden mit LPS stimuliert. Der Einfluß auf die mRNA konnte anschließend durch Northern- Blot Analysen untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass durch Aktivierung von PPAR α in Monozyten, Makrophagen und THP-1 Zellen eine Hemmung der LPS- induzierten TF mRNA Expression auftritt.

Weiterhin sollte untersucht werden, was für einen Effekt die PPARγ-Aktivatoren BRL und PGJ_2 auf die LPS-induzierte TF oder TNFα Expression in Monozyten haben. Hier zeigte sich kein inhibierender Effekt, wie bei dem PPARα Aktivator WY. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit dem Bericht von Jiang [27], welches zeigte, dass PPARγ-Aktivatoren die PMA (Phorbol 12- myristate 13-acetate) aber nicht LPS-induzierte TNF-α hemmt. Chinetti et al haben beschrieben, dass humane Monozyten PPARα und PPARγ exprimieren, doch die Menge von PPARγ in diesen Zellen deutlich weniger exprimiert wird [6]. Dies könnte eine Erklärung für den fehlenden Effekt von PPARγ auf TF und TNFα Expression sein. Denkbar wäre natürlich noch eine Hemmung von verschiedenen PPAR-Subtypen an der Genregulation.

Eine niedrigere Konzentration von WY 14643 scheint bei unseren Versuchen mit Monoyten-derived Makrophagen (ca. 60% Reduktion bei 100µmol/L WY) eine ähnliche hohe Hemmung zu zeigen, im Vergleich mit frisch isolierten Monozyten (ca. 57% bei 250µmol/L WY). Dieses Ergebnis könnte erklärt werden durch eine Arbeit von Chinetti et al, dass in Makrophagen eine höhere PPARα Expression vorliegt, als in Monozyten [6].

4.1. Atherosklerose und erhöhte TF Expression

Plaqueruptur mit darüber gelagerter Thrombose ist die Hauptursache für akutes Koronarsyndrom, wie instabile Angina, Myokardinfarkt und plötzlichem Herztod. Dabei spielt die erhöhte monozytäre TF eine entscheidende Rolle in der Koagulation und Thromogenität des atherosklerotischen Plaques [19]. Physiologisch können verschiedene Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren, inflammatorische Cytokine (IL-1ß und TNFα), oxidierte LDL und Endotoxin, die Expression von TF in Monozyten induzieren [15].

Eine erhöhte Expression von Tissue Faktor bei Patienten mit Atherosklerose und auch arterielle Interventionen führen zu den atherothrombotischen Komplikationen. In der atherosklerotischen Plaque vorkommende, und im akuten Myokardifarkt freigesetzte inflammatorische Mediatoren induzieren die TF-Expression in Monozyten [5,8,38,62].

In verschiedenen klinischen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit instabiler Angina erhöhte Spiegel von TF Expression nachweisbar sind, als bei Patienten mit stabiler Angina [3,28, 32,63]. Auch nach Reperfusion im akuten Myokardinfarkt [50] und während extracorporaler Zirkulation bei Bypassoperation [49] zeigt sich eine verstärkte monozytäre TF Expression.
Viele dieser Studien zeigen das erhöhte TF Expression sich nicht nur auf die akute Thrombose auswirkt, sondern auch auf die Atherogenese, die koronare Restenose und auch eine anhaltende Thrombinbildung nach Interventionen beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass eine Hemmung der TF-Expression den klinischen Verlauf akuter Koronarsyndrome positiv beeinflussen könnte, doch über inhibitorische Mechanismen der TF-Expression war bisher wenig bekannt.

4.2. Hemmung der TF Expression in vivo

Es gab verschiedene Publikationen, die mit unterschiedlichen Substanzen eine Besserung des klinischen Verlaufs akuter Koronarsyndrome erbrachten. Jedoch war zu diesem Zeitpunkt der Mechanismus dieser positiven Effektes nicht bekannt.

Klinische Arbeiten von Harker et. al [22] und Tremoli et. al. [69] fanden, dass diätische Anreichung von Fischöl oder die Verabreichung von n-3 Fettsäuren die TF Aktivität in unstimulierten und LPS-stimulierten Monozyten inhibiert. Dieser Effekt wurde bei gesunden

Probanden, bei Patienten mit Hypertriglyceridämie [69], und bei nichthumanen Primaten untersucht [22]. Die n-3 Fettsäuren konnten als PPAR α- Agonisten gezeigt werden [35], so dass die oben beschriebenen Effekte auf eine PPARα-Aktivierung zurückzuführen sein könnten.

Eine weitere Arbeit von Aikawa et al. zeigte auch eine abnehmende Expression und Aktivität von TF durch diätische Lipidsenkung in Atheromen von Kaninchen [2].

Pellegrini et al. konnten in ihrer Arbeit keinen Effekt von n-3 Fettsäuren auf unstimulierte oder endotoxin-stimulierte mononucleäre Zellen bei gesunden Probanden anzeigen [52].

In der Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Studie von Rubins et al. zeigte die Behandlung mit Gemfibrozil (Lipidsenker) bei Probanden mit bekannter Atherosklerose eine signifikante Reduzierung kardiovaskulärer Ereignisse bei erhöhten HDL-Spiegel und erniedriegtem Spiegel von Triglyceriden ohne jedoch Änderungen des LDL-Spiegel [57]. Auch Fibrate wie Gemfibrozil sind wie die ungesättigten Fettsäuren, Aktivatoren des PPAR α [35].

Auch die Lyon Heart Studie zeigte, dass eine mediterrane Diät bei Patienten mit ersten Herzinfarkt, ebenfalls die koronaren Risiken langfristig reduzieren könnte, ohne wesentliche Änderung des LDL-Spiegels [11].

4.3. PPAR α in vaskulären Zellen

Die Substanzen der oben aufgeführten Studien wie ungesättigte Fettsäuren (Docosahexanoic acid DHA, Eicosapentanoic EPA oder Eicosatetranoyc acid ETYA, WY 14643 oder Gemfibrozil sind Liganden
für den nukleären Transkriptionsfaktor Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) [17].

Peroxisome proliferator-activated receptors sind Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren, welche die Expression spezifischer Zielgene regulieren. PPAR α wurde 1996 von Schoonjans et al. als ein wichtiger Regulator der Gen-Expression im Lipid-Metabolismus beschrieben [60,64].
Seit der Entdeckung der Peroxisome proliferator-activated receptors zeigt sich nach mehrjähriger Forschung, dass die Rezeptoren PPARα und PPARγ außer der Regulierung der Genexpression im Lipidmetabolismus und Adipogenese auch eine bedeutende anti-inflammatorische Eigenschaft in vaskulären Zellen besitzen und somit eine sehr wichtige Rolle in der Atherosklerose spielen.

PPAR-Rezeptoren, die ursprünglich in der Leber von Nagern als Rezeptoren für lipidsenkende Substanzen identifiziert wurden, konnten beim Menschen in verschiedenen Organen exprimieren nachgewiesen werden. Die Expression von PPARα wurde in Leber, Herz und Niere gezeigt, und ist hier an der Regulation der Genexpression von Acyl-CoA Synthetase, HMG-CoA Synthetase und apo-CIII beteiligt [4].

Verschiede Arbeitsgruppen konnten die Expression von PPARα in Monozyten und Makrophagen [6], in Endothelzellen [9,42] und humanen Gefäßmuskelzellen [10,64] nachweisen.

4.4. Anti-inflammatorische Funktion des PPARα

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass PPARα die Transkription von inflammatorischen Genen inhibiert, welche in atherosklerotischen Plaques vorhanden sind.

In der frühen Phase der Entwicklung der atherosklerotischen Läsion greift PPARα in die Monozytenrekrutierung ein, indem es die TNFα induzierte VCAM-1 Expression in endothelialen Zellen hemmt. Diesen inhibierenden Effekt zeigte die Arbeitsgruppe von Marx et al. in humanen Endothelzellen der V. saphenae, welches durch Hemmung der NF –κB Signalbahn beschrieben wird [42].

Delerive et al zeigten, dass in humanen vaskulären Endothelzellen PPARα die Thrombin vermittelte Aktivierung von Endothelin-1 inhibiert [9], durch negative Interferenz mit dem AP-1 Signalweg [10]. Dabei ist Endothelin-1 ein potenter Vasoconstriktor und ein Induktor von glatten Gefäßmuskelzellen.

Platelet-activating factor (PAF) ist eine potente pro-inflammatorische Substanz, dessen Effekte durch einen spezifischen Zelloberfläche-Rezeptor (PAF-Receptor) reguliert wird. Es hat eine wichtige Rolle in der frühen Atherosklerose, da es an der Leukozyten Recruitment, an

der Cytokinproduktion und LDL Oxidation mitwirkt. Eine Arbeit von Hourton et al. konnte beweisen, dass die PPARα Aktivierung durch oxidierte LDL zur Downregulation der Expression von PAF-Rezeptoren in humanen Monozyten und Makrophagen führt, welches wiederum die Progression von atherosklerotischem Plaque Bildung regulieren könnte [24].

In humanen Gefäßmuskelzellen der Aorta führt die Aktivierung von PPARα durch Fibrate zur Hemmung der IL-1ß induzierten Expression von COX-2 und IL-6. Der Mechanismus verläuft durch Inhibierung des NF-κB und AP-1 Signalwegs [10, 64]

Delerive et al zeigten in isolierter Aorta von PPARα-deficienten Mäusen eine reduzierte „Antwort“ auf LPS, gemessen durch IL-6 Sekretion. Dieses Ergebnis zeigt eine wichtige Rolle von PPARα in der Kontrolle von vaskulärer Inflammation [9].

In der späteren Phase der Atherosklerose, vor allem in die Bildung der so genannten Schaumzellen scheint PPARα auch störend einzugreifen. Chinetti et al berichten, dass PPARα die Apoptose von aktivierten Makrophagen durch TNFα oder IFNγ erhöhen [6]. Vermutlich wird dies auch reguliert durch negative Interferenz mit dem anti-apoptotischen NF-κB Signalweg. Jedoch berichten Martinet et al. die Signifikanz der Apoptose von Makrophagen als nicht eindeutig [39]. Einerseits gibt es die Hypothese, dass die Apoptose von Makrophagen die Plaque destabilisiert, da apoptotische Zellen nicht mehr aufgenommen werden von den sogenannten „Fresszellen“. Dies könnte dann zur Instabilität der Plaques und schließlich zur Ruptur

führen. Die andere Hypothese ist, dass Apoptose der Makrophagen auch den Beginn der Inflammation von Makrophagen vermindert und verhindert außerdem die Destruktion von glatten Gefäßmuskelzellen, welches durch Kollagenbildung die Elastizität des Plaques aufrecht halten. Dies wäre möglicherweise auch ein günstiger Effekt für die Plaquestabilität.

Zusammenfassend zeigen diese Arbeiten, eine Rolle für PPARα in der Regulation der endothelialen Zellen mit Konsequenzen für die Penetration von inflammatorischen Zellen in die Intima der arteriellen Wand, außerdem eine wichtige Rolle in der Lipidakkumulation und Bildung der Schaumzellen und letztendlich auch große Rolle in der Plaquestabilität. Insgesamt scheint PPARα einen anti-atherosklerotischen Effekt zu haben.

Unsere Ergebnisse der Hemmung der TF-Expression in Monozyten und Makrophagen durch PPARα könnten eine bedeutende Rolle in der Modulation der Thrombosebildung spielen, und dadurch kardiovaskuläre Ereignisse positiv beeinflussen.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte ob, der Peroxisome proliferator-activated receptor-α (PPAR-α) ein inhibitorischer Regulator der Tissue Factor-Genexpression in Monozyten, Makrophagen und THP-1 Zellen (monozytenähnliche Zellen) sein könnte.

Mittels Northern Blot Analysen konnte auf mRNA Ebene gezeigt werden, dass der Peroxisome proliferator-activated receptor-α Aktivator 4-Chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio acetic acid (WY 14643) die Lipopolysaccharid-induzierte Tissue Factor Expression in Monozyten, Makrophagen und THP-1 Zellen inhibiert. In Monozyten und Makrophagen konnte zudem dargestellt werden, dass die Inhibition des Tissue Factors konzentrationsabhängig ist.

So zeigen unsere Ergebnisse eine neue mögliche Rolle für PPARα in der Modulation der Thrombogenität atherosklerotischer Läsionen.
Diese Regulation wäre auch von Bedeutung, dass weitere PPARα-Liganden, wie Fenofibrat oder Gemfibrozil, als lipidsenkende Medikamente bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

[1] Agraou B, Corseaux D, McFadden EP, Bauters A, Cosson A, Jude B: Effects of coronary angioplasty on monocyte tissue factor response in patients with stable or unstable angina. Thromb Res 1997; 88: 237-243

[2] Aikawa M, Voglic SJ, Sugiyama S, Rabkin E, Taubman MB, Fallon JT, Libby P. Dietary lipid lowering reduces tissue factor expression in rabbit atheroma. Circulation 1999; 100: 1215-1222

[3] Ardissino D, Merlini PA, Ariens R, et al. Tissue-factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. Lancet 1997; 349: 769-771

[4] Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. Diabetes 1997; 46: 1319-1327

[5] Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA Jr: Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. Proc Natl Acad Sci 1986; 83: 4533-4537

[6] Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, et al. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. J Biol Chem 1998; 273: 25573-25580

[7] Chromocynski P., Sacchi N.; Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction; Anal Biochem 1987; 162: 191-201

[8] Conkling PR, Greenberg CS, Weinberg JB. Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U937 and peripheral blood monocytes. Blood 1988; 72: 128-133

[9] Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. J Biol Chem 1999; 274: 32048-32054

[10] Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B. PPAR activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the AP-1 signaling pathway. Circ Res 1999; 85: 394-402

[11] De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N: Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. Circulation 1999; 99: 779-785

[12] Del Prete G, **De Carli M**, **Lammel RM**, **D'Elios MM**, **Daniel KC**, **Giusti B**, **Abbate R**, **Romagnani S**: Th1 and Th2 T-helper cells exert opposite regulatory effects on procoagulant activity and tissue factor production by human monocytes. Blood 1995; 86: 250-257

[13] Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS: Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. Am J Pathol 1989; 134: 1087-1097

[14] Duval C, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Staels B The role of PPARs in atherosclerosis. Trend Mol Med 2002; 8: 422-430

[15] Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. : The structural biology of expression and function of tissue factor. Thromb Haemost 1991; 66: 67-79

[16] Ernofsson M, Siegbahn A. Platelet-derived growth factor-BB and monocyte chemotactic protein-1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor. Thromb Res 1996; 83: 307-320

[17] Forman BM, Chen J, Evans RM.: Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 4312-4317

[18] Freeburn JC, **Wallace JM**, **Strain JJ**, **Sinnamon DG**, **Craig BM**, **Johnson D**, **Gilmore WS**: Monocyte tissue factor-like activity in post myocardial infarction patients. Br J Haematol 1998; 102: 605-608

[19] Fuster V, Fallon JT, Badimon JJ, Nemerson Y. The unstable atherosclerotic plaque: clinical significance and therapeutic intervention. Thromb Haemost 1997; 78: 247-255

[20] Giesen L.A. Peter, M.D., Ph.D. and Yale Nemerson, Ph.D.: Tissue factor on the Loose: Semin Thromb Hemost 2000; 26: 379-384

[21] Gregory SA, **Edgington TS**.: Tissue factor induction in human monocytes. Two distinct mechanisms displayed by different alloantigen-responsive T cell clones. J Clin Invest 1985; 76: 2440-2445

[22] Harker LA, Kelly AB, Hanson SR, Krupski W, Bass A, Osterud B, FitzGerald GA, Goodnight SH, Connor WE. Interruption of vascular thrombus formation and vascular lesion formation by dietary n-3 fatty acids in fish oil in nonhuman primates. Circulation 1993; 87: 1017-1029

[23] Hatakeyama K, Asada Y, Marutsuka K, Sato Y, Kamikubo Y, Sumiyoshi A.: Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions. Atherosclerosis 1997; 133: 213-219

[24] Hourton D, Delerive P, Stankova J, Staels B, Chapman MJ, Ninio E. : Oxidized low-density lipoprotein and peroxisome-proliferator-activated receptor alpha down-regulate platelet-activating-factor receptor expression in human macrophages. Biochem J 2001; 354: 225-232

[25] Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1998; 246: 370-374

[26] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 1990; 347: 645-650

[27] Jiang C, Ting AT, Seed B. PPARgamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. Nature 1998; 391: 82-86

[28] Jude B, Agraou B, McFadden EP, Susen S, Bauters C, Lepelley P, Vanhaesbroucke C, Devos P, Cosson A, Asseman P: Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. Circulation 1994; 90: 1662-1668

[29] Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 2160-2164

[30] Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM.: Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 4318-4323

[31] Landers SC, Gupta M, Lewis JC: Ultrastructural localization of tissue factor on monocyte-derived macrophages and macrophage foam cells associated with atherosclerotic lesions. Virchows Arch 1994; 425: 49-54

[32] Leatham EW, Bath PM, Tooze JA, Camm AJ. Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease. Br Heart J 1995; 73: 10-13

[33] Lesnik P, Rouis M, Skarlatos S, Kruth HS, Chapman MJ: Uptake of exogenous free cholesterol induces upregulation of tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 10370-10374

[34] Libby P. Changing concepts of atherogenesis. J Intern Med 2000; 247: 349-358

[35] Libby P.: Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation 2001; 104: 365-372

[36] Libby P, MD; Paul M. Ridker, MD; Attilio Maseri, MD: Inflammation and Atherosclerosis. Circulation 2002; 105: 1135-1143

[37] Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature 2000; 407: 233-241

[38] Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P.: Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. Circulation 1997; 96: 396-399

[39] Martinet W, Kockx MM. Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. Curr Opin Lipidol 2001; 12: 535-541

[40] Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. Circ Res 1998; 83: 1097-1103

[41] Marx N, Sukhova G, Murphy C, **Libby P, Plutzky J.** Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. Am J Pathol 1998; 153: 17-23

[42] Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. Circulation 1999; 99: 3125-3131

[43] Marx N, Libby P, Plutzky J: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their role in the vessel wall: possible mediators of cardiovascular risk? J Cardiovasc Risk 2001; 8: 203-210

[44] McGill HC Jr, McMahan CA. Determinants of atherosclerosis in the young. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. Am J Cardiol 1998; 82: 30-36

[45] Moons Arno H.M., Marcel Levi, Ron J.G. Peters: Tissue factor and coronary artery disease. Cardivasc Research 2002; 53: 313-325

[46] Morrisey JH, Fakhrai H, Edgington TS: Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. Cell 1987; 50: 129-135

[47] Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W.: Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. J Clin Invest 1997; 100: 2680-2690

[48] Nemerson Y. The Tissue Factor pathway of blood coagulation. Semin Haematol 1992; 29: 170-176

[49] Nilsen DW, Almdahl SM, Svensson B, Vaage J, Rasmussen K, Osterud B: Lipopolysaccharide induced monocyte thromboplastin synthesis and coagulation responses in patients undergoing coronary bypass surgery after preoperative supplementation with n-3 fatty acids. Thromb Haemost 1993; 70: 900-902

[50] Ott I, Neumann FJ, Kenngott S, Gawaz M, Schomig A.: Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction. Am J Cardiol 1998; 82: 938-942

[51] Osnes LT, Westvik AB, Joo GB, Okkenhaug C, Kierulf P: Inhibition of IL-1 induced tissue factor (TF) synthesis and procoagulant activity (PCA) in purified human monocytes by IL-4, IL-10 and IL-13. Cytokine 1996; 8: 822-827

[52] Pellegrini G, Totani L, Di Santo A, Piccoli A, Tacconi MT, Donati MB, Lorenzet R: Supplementation-induced changes in polyunsaturated fatty acid membrane and plasma composition do not modify mononuclear cell procoagulant activity. Thromb Res 1993; 71: 95-101

[53] Petersen S, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernandez R and Gray A: European cardiovascular disease statistics. European Heart Network and the British Heart Foundation 2005; 2: 10-15

[54] Poon M, Hsu WC, Bogdanov VY, Taubman MB.: Secretion of monocyte chemotactic activity by cultured rat aortic smooth muscle cells in response to PDGF is due predominantly to the induction of JE/MCP-1. Am J Pathol 1996; 149: 307-317

[55] Ross, R.: Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340: 115-126

[56] Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. Nature 1998; 391: 79-82

[57] Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. N Engl J Med 1999; 341: 410-418

[58] Ruf W, Edgington TS: Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. FASEB J 1994; 8: 385-390

[59] Scarpati EM, Wen D, Broze GJ Jr, Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, Sadler JE.: Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. Biochemistry 1987; 26: 5234-5238

[60] Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. Biochim Biophys Acta 1996; 1302: 93-109

[61] Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J.: PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. EMBO J 1996; 15: 5336-5348

[62] Schwager I, Jungi TW. Effect of human recombinant cytokines on the induction of macrophage procoagulant activity. Blood 1994; 83: 152-160

[63] Serneri GG, Abbate R, Gori AM, Attanasio M, Martini F, Giusti B, Dabizzi P, Poggesi L, Modesti PA, Trotta F: Transient intermittent lymphocyte activation is responsible for the instability of angina. Circulation 1992; 86: 790-797

[64] Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A.: Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. Nature 1998; 393: 790-793

[65] Takano H, Komuro I.: Roles of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in cardiovascular disease. J Diabetes Complications 2002; 16: 108-114

[66] Taubman MB, **Marmur JD**, **Rosenfield CL**, **Guha A**, **Nichtberger S**, **Nemerson Y**: Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca2+ mobilization and protein kinase C activation. J Clin Invest 1993; 91: 547-552

[67] Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM.: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. Cell 1994; 79: 1147-1156

[68] Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. Circulation 1997; 95: 594-599

[69] Tremoli E, Eligini S, Colli S, Maderna P, Rise P, Pazzucconi F, Marangoni F, Sirtori CR, Galli C. n-3 fatty acid ethyl ester administration to healthy subjects and to hypertriglyceridemic patients reduces tissue factor activity in adherent monocytes. Arterioscler Thromb 1994; 14: 1600-1608

[70] Vamecq J, Latruffe N.: Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. Lancet 1999; 354: 141-148

[71] Vora DK, Fang ZT, Liva SM, Tyner TR, Parhami F, Watson AD, Drake TA, Territo MC, Berliner JA. Induction of P-selectin by oxidized lipoproteins. Separate effects on synthesis and surface expression. Circ Res 1997; 80: 810-818

[72] Wilcox JN. Smith KM, Schwartz SM, Gordon D: Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in atherosclerotic plaque. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2839-2834

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. V. Hombach, ärztlicher Direktor der Abteilung Innere II, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas

Für die hervorragende Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit danke ich Prof. Dr. Marx. Bedanken möchte ich mich auch für seine unendliche Geduld, die er bis zum Ende dieser Arbeit hatte. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können.

Bettina Kehrle und Miriam Grüb danke ich für die schöne Arbeitsatmosphäre in unserer Arbeitsgruppe. Danke auch an die Mitarbeiter des Labors der Abteilung Innere Medizin I, bei denen ich meine Ergebnisse auswerten konnte.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mann Ali Incekara, meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich bis zum Ende mit viel Geduld, Unterstützung und Aufmunterung begleitet haben.